

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年11月14日 (14.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/089854 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 48/00, 38/22, A61P 17/02, 17/14

(KOTANI,Hitoshi) [JP/JP]; 〒560-0085 大阪府 豊中市
上新田1-24 C-1101号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/04529

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2002年5月9日 (09.05.2002)

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:

(26) 国際公開の言語: 日本語

— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。

(30) 優先権データ:
特願2001-139373 2001年5月9日 (09.05.2001) JP

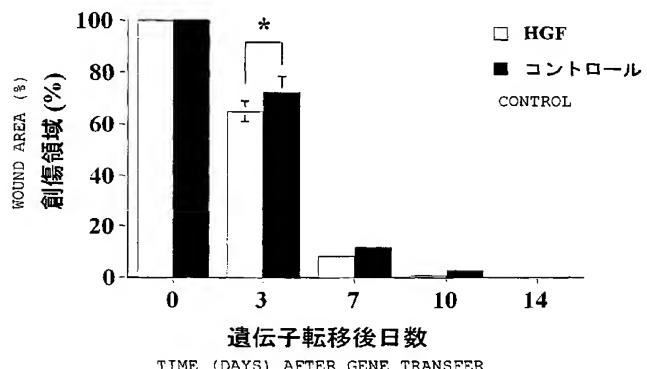
2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アンジェ
ス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒
560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町1丁目四番二号
Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森下 竜一
(MORISHITA,Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府 大
阪市 淀川区宮原2-1 1-2 2-5 02 Osaka (JP). 中
西 邦昭 (NAKANISHI,Kuniaki) [JP/JP]; 〒359-0003
埼玉県 所沢市 中富南4-7-9 Saitama (JP). 金田
安史 (KANEDA,Yasufumi) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪
府 箕面市 小野原東6-1 2-8 Osaka (JP). 小谷 均

(54) Title: GENE TRANSFER OF ANGIOGENIC FACTOR FOR SKIN DISEASE

(54) 発明の名称: 血管新生因子の皮膚疾患への遺伝子導入



(57) Abstract: Remedies or preventives containing as the active ingredient an angiogenic factors such as hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) or hypoxia inducible factor (HIF) are administered to a part suffering from a skin disease as the target site.

[続葉有]

WO 02/089854 A1



(57) 要約:

肝細胞増殖因子（HGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、纖維芽細胞増殖因子（FGF）及びhypoxia inducible factor（HIF）等の遺伝子の血管新生因子遺伝子を有効成分として含有する治療剤又は予防剤として用いて、皮膚疾患の患部を標的部位として投与することに関する。

明細書

血管新生因子の皮膚疾患への遺伝子導入

技術分野

本発明は、血管新生因子遺伝子を皮膚疾患に対し用いることに関する。より詳細には、血管新生因子遺伝子を有効成分として含有する治療剤又は予防剤や、血管新生因子遺伝子を標的部位へ投与することを特徴とする方法に関する。血管新生因子には肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、纖維芽細胞増殖因子(FGF)及びhypoxia inducible factor(HIF)が含まれる。皮膚疾患には創傷、ハゲ、皮膚潰瘍、褥瘡(床ずれ)、瘢痕(ケロイド)、アトピー性皮膚炎、自家移植及び他家移植を含む皮膚移植後の皮膚の損傷等が含まれる。

背景技術

「血管新生因子」とは、親血管の内皮細胞の活性化と共に開始される新しい血管の発生や血管新生をインビボで刺激するだけでなく、インビトロで内皮細胞に対してマイクロジェニックであることが示されている増殖因子のことである。血管新生因子としてはHGF、VEGF、FGF及びHIF等が挙げられる。血管新生因子の治療的な適用は、Folkmanらによって最初に文献発表された(N. Engl. J. Med. 285, 1182-1186(1971))。またはその後の研究によって、組換え血管新生因子、例えばFGFファミリー(Science 257, 1401-1403(1992), Nature 362, 844-846(1993))及びVEGF等を使用して心筋、及び、下肢虚血症の動物モデルにおける側副血行路の発達を促進及び/又は増進させ得ることが確認されている(Circulation 90, II-228-II-234(1994))。さらに本発明者らは、HGFがVEGFと同様に内皮特異的増殖因子として作用することを見出している(J. Hypertens. 14, 1067-1072(1996))。

HGF は、成熟幹細胞に対する強力な増殖促進因子として発見されたサイトカインであり、その遺伝子クローニングもされている [Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 1450 (1984); Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 6489 (1986); FEBS Letters 22: 231 (1987); Nature 342: 440-443 (1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 3200 (1991)]。HGF はプラスミノーゲン関連及び間充織由来多面的成長因子であり、種々の型の細胞において細胞成長と細胞運動性を調節することが知られている [Nature 342: 440-443 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 639-644 (1997); J. Biochem. Tokyo 119: 591-600 (1996)]。さらに、胚新生、及び、幾つかの器官の再生の間の形態形成工程を調節する重要な因子である。例えば、HGF は肝細胞、及び、角化細胞を含む他の表皮細胞の強力なマイトジエンである [Exp. Cell Res. 196: 114-120 (1991)]。HGF は血管新生を刺激し、細胞の分離を誘導し、内皮細胞の運動を開始する [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1937-1941 (1993); Gene Therapy 7: 417-427 (2000)]。その後の研究により HGF は *in vivo* において肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療又は予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなった [Symp. Soc. Exp. Biol., 47cell_behavior 227-234 (1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1937-1941 (1993); Circulation 97: 381-390 (1998)]。ウサギの下肢虚血モデルにおいて HGF を投与すると、顕著な血管新生が見られ血流量の改善、血圧減少の抑制、虚血症状の改善が生じたとの報告がある。これらの報告により、今日では、血管新生因子の一つとして HGF が発現、機能していると考えられるようになった。

その名が示すように、肝臓で発見された物質であるが、実際には体中に存在している。この HGF には細胞を増殖させる作用がある。怪我をすると、その周辺でさかんに細胞分裂が起きて傷口が修復されるが、これも HGF の働きによる。順天堂大学の皮膚科チームは、この物質が、毛髪増殖因子の一つであるということをつきとめた。HGF には毛母細胞の分裂を促して、毛髪を成長させる働きを

有する。男性ホルモンによって軟毛化の進んだ頭皮の毛母細胞にこのHGFを投与すれば、太い毛が再生すると考えられる。

また、ラットの非梗塞性及び梗塞性心筋の心臓[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8474-8478 (1993)]、並びに、ラット角膜[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1937-1941 (1993)]においてHGFにより血管新生が誘導されるという *in vivo* の事実が発見されている。

このようにHGFは血管新生因子の機能を初めとして種々の機能を有し、それを医薬品として活用するための様々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題となってきたのがHGFの血中での半減期である。HGFの半減期は約10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、HGF有効量の患部への移行性が問題となつた。

VEGFは内皮細胞に対してマイトジェニックな2量体糖タンパク質であり、そして血管透過性を高める能力を有している。VEGFは内皮細胞に対して直接的で、特異的なマイトジェニックな効果を有している(Biochem. Biophys. Res. Commun. , 161, 851-858 (1989))。

HIFは赤血球の産生を促進し、全身に酸素の供給量を増加させるエリスロポエチン、血管新生を促し、局所的な酸素供給を増加させるVEGFとその受容体、無酸素状態でATPを合成し細胞に耐性を与える、解糖系の諸酵素の遺伝子の転写活性化を中心となって行う転写因子である。HIF-1はHIF-1 α とHIF-1 β からなるヘテロダイマーであり、HIF-1 β (Arntともよばれている)はダイオキシン等の外来異物の代謝に関与している、Ahリセプターともヘテロダイマーを形成し、薬物代謝酵素遺伝子群の転写調節に機能していることが、既に判明している。

一般に遺伝子治療は多様な離床疾患の処置において使用することができる[Science 256: 808-813 (1992); Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987)]。遺伝子治療を成功させる上で特に重要なのは、遺伝子導入のための適当なベクターの選択である。特にアデノウイルス等のウイルスが遺伝子導入において好ましいベクタ

一である。しかしながら、ウイルスの有する感染毒性、免疫系の低下、及び、突然変異性または発ガン性効果を考慮するとウイルスベクターは潜在的に危険である。その代替方法としては、効果的な *in vivo* 遺伝子導入方法として報告されているリポソームをウイルス外膜と共に利用し、毒性のほとんどない HVJ-リポソーム媒介遺伝子導入が挙げられる [*Science* 243: 375-378 (1989); *Anal. NY Acad. Sci.* 772: 126-139 (1995)]。該方法は、肝臓、腎臓、血管壁、心臓及び脳を含む種々の組織への *in vivo* 遺伝子導入の方法として成功している [*Gene Therapy* 7: 417-427 (2000); *Science* 243: 375-378 (1989); *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 129-134 (1992); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8474-8478 (1993); *Am. J. Physiol.* 271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40): R1212-R1220 (1996)]。

創傷治癒は炎症、血管新生、マトリックス合成及びコラーゲン沈着を含む事象の系列から成り、再内皮形成、血管新生及び顆粒組織の形成へとつながる [Clark RAF 編 "Overview and general consideration of wound repair. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair." Plenum Press. New York (1996) 3-50; *Annu. Rev. Med.* 46: 467-481 (1995); *J. Pathol.* 178: 5-10 (1996)]。治癒工程は線維芽細胞 (FGF)、形質転換成長因子- α (TGF- α)、形質転換成長因子- β (TGF- β)、上皮細胞成長因子 (EGF)、血小板由来成長因子 (PDGF) 及び血管内皮細胞成長因子 (VEGF) 等の成長因子を含む多数のマイトジエン及び走化性因子により調節される。しかしながら、HGF の創傷治癒における効果に関する研究はあまり存在しない [*Gastroenterology* 113: 1858-1872 (1997)]。

IGF、PDGF 及び EGF 等の遺伝子の創傷への転移についての報告が幾つか存在する [*Gene Therapy* 6: 1015-1020 (1999); *Lab. Invest.* 80: 151-158 (2000); *J. Invest. Dermatol.* 112: 297-302 (1999); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12188-12192 (1994)] が、そのどれもが HGF 遺伝子転移後の創傷治癒に関する、または、組織病理学効果に含まれる因子の数の定量的、及び質的変化には着目していない。

創傷の再上皮化は角化細胞の創傷の端から中央への移動により起こる。In vitro では、HGF は増殖、細胞成長、及び、生理的 Ca^{2+} 条件下で培養される角化細胞での DNA 合成を増幅する [Exp. Cell Res. 196: 114-120 (1991)]。さらに、HGF は細胞ターンオーバーの増幅により T84 腸内単層中の上皮による創傷密閉が促進されることが発見された [J. Clin. Invest. 93: 2056-2065 (1994)]。組換え HGF の in vivo 投与が抗腫瘍剤により損傷を受けたラット腎臓中の上皮細胞の再生を促進することが発見された [Gene Therapy 7: 417-427 (2000)]。しかしながら、ラットの凍傷により惹起された胃潰瘍への組換え HGF の皮下投与により、血清中のヒト HGF 濃度は増加したが、胃潰瘍治癒速度には効果を示さず、凍傷惹起 8~15 日後胃縁で上皮細胞増殖が増加した [Gastroenterology 113: 1858-1872 (1997)]。

TGF- β 発現の一過性の上向き調節は、創傷治癒における重要な事象である。TGF- β は纖維芽細胞を刺激してマトリックスタンパク、マトリックスプロテアーゼ阻害剤、及び、インテグリン受容体を産生し、それにより創傷部位のマトリックス形成、及び、細胞間相互作用を調節する [Rokerts AB, Aporn MB: "Transforming growth factor- β . The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair" 第二版, Clark RAF 編 (Plenum Press. New York, 1996 年, 第 275~308 頁)]。TGF- β 1 の異常調節、及び、持続的過剰発現は皮膚纖維症(例えば、肥大瘢痕及びケロイド)の患者の組織中で TGF- β 1 mRNA の発現が増大していることが報告されており [Am. J. Pathol. 152: 485-493 (1998)]、組織纖維症の増加に寄与すると考えられる。さらに、TGF- β 中和抗体は成人創傷において創傷肉芽組織中の細胞を減少するだけでなく、新真皮の構造を改善した [Lancet 339: 213-214 (1992)]。

一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内への投与が常識となっており、虚血性疾患モデルに対する HGF の投与に関しては、静脈や動脈内への投与の例が示されている [Circulation 97: 381-390 (1998)]。このような動物モデルでの静脈または動脈内投与により、虚血性疾患又は動脈疾患に対する HGF の有効性が明らかに

されているものの、具体的な HGF の有効な投与方法及び投与量等については未だ結論が出ていない。特に HGF タンパクの場合は、前記のような半減期の問題、患部への移行性の問題もあり、有効な投与法または投与量等については未だ結論が出ていない。

発明の開示

本発明の目的は、血管新生因子遺伝子を用いた皮膚疾患に対する治療剤若しくは予防剤、及び、該薬剤を用いることに関する。

本発明者らは、血管新生因子の一つである HGF は創傷治癒の間、上皮修復及び血管新生を促進するかも知れないと考え、i) 遺伝子転移後、ヒト HGF mRNA 及びタンパク質が完全な厚さの創傷内に分布し、沈着するか、ii) 遺伝的に転移されたタンパク質が生物学的に活性であるか、及び、iii) 転移されたタンパク質が病理学状態(例えば、完全な厚さの創傷内のいくつかの細胞を含むマイトジエン活性、並びに、顆粒組織内の再上皮化、血管新生及び細胞外マトリックスの沈着等)に生物学的な影響を及ぼすかを調べた。

さらに、創傷組織におけるこれらの変化が TGF- β 1 の分泌と関連しているかを調べた。創傷領域、並びに、HGF 遺伝子転移後の創傷組織中のヒト及びラット HGF タンパク質濃度、並びに、TGF- β 1、及び、コラーゲン型 I (Col α 2(I))、コラーゲン型 III (Col α 1(III))、デスミン及び血管平滑筋 α -アクチン (α -sm-アクチン) を含む創傷治癒に関わっていると考えられている他の構成因子の mRNA の発現を測定した。このために半定量逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用い、in situ ハイブリダイゼーション及び免疫組織化学的方法により創傷の形態形成変化を調べた。

その結果、本発明者らは、皮膚疾患に対して、直接患部に血管新生因子遺伝子を投与することにより、極めて有効な結果が得られることを明らかにした。具体的には皮膚創傷において、血管新生因子遺伝子を投与することにより、有効な効

果が得られることを見出した。

このような血管新生因子遺伝子による治療は非侵襲的な治療法であるため、病状に応じて何回でも当該遺伝子を投与することが可能であるという特徴を有する。

即ち、本発明の要旨は以下の通りである。

- (1) 血管新生因子遺伝子を有効成分として含有する、皮膚疾患の治療剤又は予防剤。
- (2) 血管新生因子遺伝子が HGF 遺伝子、VEGF 遺伝子、FGF 遺伝子または HIF 遺伝子である、上記 (1) の治療剤又は予防剤。
- (3) 該皮膚疾患が創傷、ハゲ、皮膚潰瘍、褥瘡(床ずれ)、瘢痕(ケロイド)、または、自家移植及び他家移植を含む皮膚移植後の皮膚の損傷である、上記 (1) の治療剤又は予防剤。
- (4) 該治療剤又は予防剤が錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル剤、軟膏、シロップ、スラリー、懸濁物の形態である、上記 (1) 若しくは (2) の治療剤又は予防剤。
- (5) 遺伝子を内包型リポソーム法、静電気型リポソーム法、HVJ-リポソーム法、改良型 HVJ-リポソーム法、ウイルスエンベロープベクター法、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクルガン(遺伝子銃)で担体と共に DNA 分子を細胞に移入する方法、naked-DNA の直接導入法、超音波の照射と共に DNA 分子を細胞に移入する方法、エレクトロポレーション法、または、正電荷ポリマーによる導入法により細胞に移入するための、上記 (1) ~ (3) いずれかの剤。
- (6) 血管新生因子遺伝子を哺乳動物に導入することを含む、皮膚疾患の治療法又は予防法。
- (7) 皮膚疾患の治療剤又は予防剤の製造のための血管新生因子遺伝子の使用。

本発明において使用する「血管新生因子遺伝子」とは、血管新生増殖因子を発現可能な遺伝子を指す。ここで「血管新生因子」とは、親血管の内皮細胞の活性化と共に開始される新しい血管の発生や血管新生をインビボで刺激するだけでな

く、インビトロで内皮細胞に対してマイトジェニックであることが示されている増殖因子を指し、後述する HGF、VEGF、FGF 及び HIF 等が含まれる。

本発明において使用する「HGF 遺伝子」とは、HGF (HGF タンパク) を発現可能な遺伝子を指す。具体的には Nature 342, 440 (1989)、特許第 2777678 号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163: 967 (1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun. 172: 321 (1990) 等に記載の HGF の cDNA を後述のような適当な発現ベクター(非ウイルスベクター、ウイルスベクター)に組み込んだものが挙げられる。ここで HGF をコードする cDNA の塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank 等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当な DNA 部分を PCR のプライマーとして用い、例えば肝臓や白血球由来の mRNA に対して RT-PCR 反応を行うこと等により、HGF の cDNA をクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えば Molecular Cloning 第二版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

本発明において使用される「VEGF 遺伝子」とは、VEGF (VEGF タンパク) を発現可能な遺伝子を指す。すなわち、VEGF の cDNA を後述の如き適当な発現ベクター(非ウイルスベクター、ウイルスベクター)に組み込んだものが例示される。VEGF 遺伝子は、ヒトにおいては転写に際しての選択的スプライシングにより、4 種類のサブタイプ (VEGF121、VEGF165、VEGF189、VEGF206) の存在が報告されている (Science 219, 983 (1983); J. Clin. Invest. 84, 1470 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 851 (1989))。本発明においてはこれらいずれの VEGF 遺伝子を使用することができるが、生物学的に最も活性が強い VEGF165 遺伝子がより好ましい。該 VEGF 遺伝子は文献 (Science, 246, 1306 (1989)) 記載の配列及びデータベースに登録されている配列情報に基づき、当業者ならば容易にクローニングすることができ、またその改変等も容易に行うことができる。

本発明において使用される「FGF 遺伝子」及び「HIF 遺伝子」とは、各々、FGF

及び HIF を発現可能な遺伝子を指す。HGF や VEGF と同様に、後述の如き適当な発現ベクター(非ウイルスベクター、ウイルスベクター)に組み込んだものが例示される。該遺伝子は公知の文献記載の配列及びデータベースに登録されている配列情報に基づき、当業者ならば容易にクローニングすることができ、またその改変等も容易に行うことができる。

さらに、本発明の血管新生因子遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパク質が血管新生因子としての作用を有する遺伝子である限り、本発明の血管新生因子遺伝子として使用できる。即ち、1) 前記 c DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA や、2) 前記 c DNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して 1 若しくは複数(好ましくは数個)のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA 等のうち、本発明の血管新生因子としての作用を有するタンパクをコードするものであれば、本発明の血管新生因子遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記 1) 及び 2) の DNA は例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR 法[Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6. 1-6. 4] 又は通常のハイブリダイゼーション法[Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6. 3-6. 4] 等により容易に得ることができる。

即ち、当業者であれば、上述の血管新生因子遺伝子をまたはその一部をプローブとして、あるいは、該血管新生因子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、該 DNA とハイブリダイズする DNA を単離することができる。機能的に血管新生因子と同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件は、通常「 $1 \times$ SSC、 37°C 」程度であり、より厳しい条件としては「 $0.5 \times$ SSC、 0.1% SDS、 42°C 」程度であり、さらに厳しい条件としては「 $0.1 \times$ SSC、 0.1% SDS、 65°C 」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意性

を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS 及び温度条件の組合せは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記、若しくは他の条件(プローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション法あるいは PCR 法により単離される遺伝子によりコードされるタンパク質は、従来公知の血管新生因子と比較して、通常、そのアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相同意とは少なくとも 50%以上、さらに好ましくは 70%以上、さらに好ましくは 90%以上(例えば 95%以上)の配列相同意を指す。アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX 等のプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLAST に基づき BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score=100、wordlength=12 とする。また、BLAST に基づき BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score=50、wordlength=3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態及び導入量等について記述する。

HGF 遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の 2 つに大別され、実験手引書等にその調製法、投与法が詳しく解説されている[別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社(1996)；別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社(1997)；日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研

究ハンドブック、エヌ・ティー・エス(1999)]。以下、具体的に説明する。

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。

細胞への遺伝子導入法としてはリポフェクション法、リン酸ーカルシウム共沈法、D E A E 一デキストラン法、微小ガラス管を用いたD N Aの直接注入法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

また、組織への遺伝子導入法としては内包型リポソーム(internal type liposome)による遺伝子導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)による遺伝子導入法、HVJ一リポソーム法、改良型HVJ一リポソーム法(HVJ一AVEリポソーム法)、ウイルスエンベロープベクター法、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクルガン(遺伝子銃)で担体(金属粒子)と共にDNA分子を細胞に移入する方法、n a k e d-D N Aの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法、超音波の照射と共にDNA分子を細胞に移入する方法等のいずれかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。

このうちHVJ一リポソームは脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス(Hemaggulutinating virus of Japan:HVJ)とを融合させたものである。当該HVJ一リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。HVJ一リポソームの調製法については[別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社(1996)；別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社(1997)；*J. Clin. Invest.* 93: 1458-1464(1994)；*Am. J. Physiol.* 271: R1212-1220(1996)]等に詳しく述べられている。またHVJリポソーム法とは、例えば*Molecular Medicine* 30: 1440-1448(1993)；

実験医学 12: 1822-1826 (1994); 蛋白質・核酸・酵素 42, 1806-1813 (1997) 等に記載の方法であり、好ましくは Circulation 92 (Suppl. II): 479-482 (1995) に記載の方法が挙げられる。

なお、HVJ としては Z 株 (ATCC より入手可能) が好ましいが、基本的には他の HVJ 株 (例えば ATCC VR-907 や ATCC VR-105 等) も用いることができる。

本明細書中の「ウイルスエンベロープベクター」とは、ウイルスエンベロープ中に外来遺伝子を封入したベクターである。ウイルスエンベロープベクターは、ウイルスのゲノムが不活性化した遺伝子導入ベクターであり、ウイルスタンパク質の複製がないため安全で細胞毒性、及び、抗原性が低い。不活性化ウイルスを用いたウイルスエンベロープベクター中に遺伝子を封入することにより、培養細胞や生体組織に対して安全で、高効率の遺伝子導入ベクターを調製することができる。ウイルスエンベロープベクターは、例えば PCT/JP01/00782 等に記載の方法に従って調製することができる。遺伝子導入ベクターの調製に使用するウイルスとしては野生型ウイルス及び組換え型ウイルスの両方が挙げられ、例えばレトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、ラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、及び、ヘパドナウイルス科等を挙げることができる。特に HVJ を用いたウイルスエンベロープベクターが好ましい。また、Hasan, M. K. ら (Journal of General Virology, 78, 2813-2820 (1997))、又は、Yonemitsu, Y. ら (Nature Biotechnology 18, 970-973 (2000)) に記載される組換え型センダイウイルスを用いて遺伝子導入ベクターを調製することもできる。

さらに、naked-DNA の直接導入法は上記手法のうち最も簡便な手法であり、この観点からも好ましい導入法である。

ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現するとのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えば p

CAGGS [Gene 108: 193-200 (1991)] や、 pBK-CMV、 pCDNA3.1、 pZeoSV (インビクトロゲン社、ストラタジーン社) 等の発現ベクターが挙げられる。

B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス(HIV)等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からはアデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する in vivo 法及びヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す ex vivo 法がある [日経サイエンス、1994年4月号: 20-45 頁; 月刊薬事 36(1): 23-48 (1994); 実験医学増刊 12(1-5): (1994); 日本遺伝学治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス (1999)]。本発明では、 in vivo 法が好ましい。

製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態(例えば液剤等)をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、当該注射剤は定法により調製することができ、例えば適切な溶剤(PBS等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等)に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソームにおいては懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の

形態とすることができます。

皮膚疾患に対して、本発明の治療剤又は予防剤は好ましくは軟膏の形態で皮膚の患部に局所投与され得る。この軟膏は皮膚に容易に塗布できる適当な稠度の全質均等な半固体の外用剤であり、通常、脂肪、脂肪油、ラノリン、ワセリン、パラフィン、蝋、硬膏剤、樹脂、プラスチック、グルコール類、高級アルコール、グリセリン、水若しくは乳化剤、懸濁剤を含み、これらを基剤としてデコイ化合物が均等に混和されたものである。基剤に依存して、油脂性軟膏、乳剤性軟膏、水溶性軟膏の形態であり得る。油脂性軟膏は動植物性油脂及び蝀、またはワセリン、流動パラフィン等を基剤とし、乳剤性軟膏は、油脂性物質と水とを乳化剤で乳化するもので、水中油型 (O/W) または油中水型 (W/O) のいずれかであり得る。水中油型 (O/W) は、親水軟膏であり得、油中水型 (W/O) は、はじめから水相を欠き、親水ワセリン、精製ラノリンを含み得るか、または水相を含む吸水軟膏、加水ラノリンを含み得る。水溶性軟膏は完全に水に溶けるマクロゴール基剤を主成分として含み得る。

好ましくは、薬学的に受容可能なキャリアは5%ステアリルアルコールを含むワセリンあるいはワセリンのみあるいは流動パラフィンを含むワセリンである。このようなキャリアは薬学的組成物が患者による摂取に適した錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル剤、軟膏、シロップ、スラリー、懸濁物等に処方されることを可能とする。

また、患部の細胞または目的とする組織の細胞内に局所投与する場合、本発明の治療剤または予防剤には、キャリアとして合成または天然の親水性ポリマーを含有させ得る。このような親水性ポリマーの例として、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリエチレングリコールが挙げられ、本発明の化合物を、適切な溶媒中でこのような親水性ポリマーと混合する。その後、溶媒を風乾等の方法により除去して、所望の形態、例えば、シート状に成型した後、標的部位に付与することができる。このような親水性ポリマーを含む製剤は、水分含量が少ないので、保

存性に優れ、使用の際には水分を吸収してゲル状となり貯留性にも優れる。このようなシートは、類似の物としてセルロース、デンプン及びその誘導体あるいは合成高分子化合物等に多価アルコールを混合して硬度を調整して形成した親水性シートも利用することができる。

本発明で用いられる HGF、VEGF、FGF 及び HIF 等の血管新生因子遺伝子から選択される遺伝子を複数併用して、若しくは、単独で、またはこれらの血管新生因子以外の血管新生作用を有する公知の因子を併用して、又は単独で用いることが可能である。例えば、EGF 等の因子は血管新生作用を有することが報告されており、これらの遺伝子を使用することができる。また EGF 等の増殖因子は組織の種々の細胞障害を修復することが報告されており、これらの遺伝子を用いることも可能である。

本発明でいう皮膚疾患には創傷、ハゲ、皮膚潰瘍、褥瘡(床ずれ)、瘢痕(ケロイド)、アトピー性皮膚炎、並びに、自家移植及び他家移植を含む皮膚移植後の皮膚の損傷等が含まれる。なお、本発明において予防剤とは、上記疾患を発症(罹患)するのを予め防ぐ効果を有する薬剤、もしくは、上記疾患を発症した際に症状を軽減する効果を有する薬剤、あるいは、症状の回復を早める効果を有する薬剤等を言い、これらの予防剤も本発明に含まれる。

ここで、ハゲとは毛周期が極端に短くなり、成長期の最中の太い毛まで抜けてしまい、その結果として細く短い軟毛ばかりが生えてくる、軟毛化現象を指す。皮膚潰瘍とは真皮ないし皮下組織に達する深い組織欠損であり、虚血性潰瘍、鬱血性潰瘍、糖尿病性潰瘍、褥瘡、放射線潰瘍及び点滴漏れ等に分類される。褥瘡とは、体の接触面から受ける持続的圧迫により組織の末梢血管が閉塞し壊死を起こす病態を指し、長期臥症中に人の後頭部・背中・腰等のように、長期間圧迫されている部位に生じる境界明瞭な、乾燥性壊死塊の付着した難治性潰瘍である。瘢痕(ケロイド)とは、皮膚損傷後に見られる結合組織の肥大増殖症であり、創面が扁平に隆起し、時に蟹足状突起を生じるものであり、増殖性を有し、元の創傷

部位を越えて周辺に拡大を続けるものもある。外傷がケロイドを形成する因子としては遺伝的、年齢的、ホルモン等の全身因子、及び、局所因子として体の部位による瘢痕のなりやすさが挙げられる。肥厚性瘢痕、瘢痕ケロイド及び真性ケロイド等に分類される。

本発明の遺伝子治療剤は治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与方法／投与部位が選択される。投与方法としては非経口的に投与することが好ましい。また投与部位としては皮膚疾患部位内に投与することが好ましい。ここで「皮膚疾患部位」とは、皮膚疾患患部及びその周辺を含む部位を指す。

皮膚疾患部位には具体的には血管内及び筋肉内等への投与、並びに、軟膏等によるその表層への投与が可能である。即ち創傷、ハゲ、褥瘡(床ずれ)、ケロイド、アトピー性皮膚炎、自家移植及び他家移植を含む皮膚移植後の患部においては、注射器やカテーテルにより血管内及び筋内に投与することにより、または、軟膏等の形態でその表面に塗布することにより患部の血管新生を促進させ血流量の改善を図り、患部の機能の回復正常化を行うことができる。

本発明のHGF遺伝子を適用することにより、創傷、ハゲ、皮膚潰瘍、褥瘡(床ずれ)、瘢痕(ケロイド)、アトピー性皮膚炎、並びに、自家移植及び他家移植を含む皮膚移植後の皮膚の損傷に対して積極的な遺伝子導入による治療を行うことができ、従来、適切な治療法の道のなかつた患者において機能の回復が可能となる。

本発明の治療剤または予防剤には、該薬剤により意図される目的を達成するのに十分な量、即ち「治療的有効量」または「薬理学的に有効な量」の血管新生因子遺伝子が含まれる。「治療的有効量」または「薬理学的に有効な量」とは、意図される薬理学的結果を生じるために有効な薬剤の量であり、処置されるべき患者の徴候を軽減するのに十分な量である。所定の適用における有効量を確認する有用なアッセイ法としては、標的疾患の回復の程度を測定する方法が挙げられる。実際に投与されるべき量は、処置される個体に依存し、好ましくは、所望の効果

が顕著な副作用を伴うことなく達成されるよう最適化された量である。

治療的有効量、薬理学的に有効な量、及び、毒性は、細胞培養アッセイまたは任意の適切な動物モデルにより決定することができる。また、そのような動物モデルは所望の濃度範囲および投与経路を達成するのに用い、当業者であれば、それに基づきヒトにおける有効量を決定することができる。治療効果と毒性効果との間の用量比は治療係数であり、それは比率 $ED50/LD50$ として表すことができる。大きな治療係数の薬学的組成物が好ましい。決定された用量は、使用される投与形態、患者の感受性、年齢やその他の患者の条件、疾患の種類、重篤さ等により適宜選択され、本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、成人患者 1 人当たり HGF 遺伝子として約 $1 \mu g$ ~ 約 $50 mg$ の範囲、好ましくは約 $10 \mu g$ ~ 約 $5 mg$ 、より好ましくは約 $50 \mu g$ ~ 約 $5 mg$ の範囲から投与量が選択される。

本発明の治療剤は数日ないし数週間に一回投与するのが好適であり、投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。本発明の治療剤は非侵襲的な投与に供されるものであるため、病状に応じて何回でも投与できるという特徴を有する。

本発明において血管新生因子遺伝子を導入する生物としては特に制限はないが、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物としては、例えばヒトやサル、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジなどの非ヒト哺乳動物を例示することができるが、これらに制限されない。

図面の簡単な説明

図 1 は、遺伝子転移後の創傷中のヒト HGF 濃度 (A) 及びラット HGF 濃度 (B) を検出した結果を示す図である。*コントロールラットにおける値に対して $p < 0.05$ 。各グループ共 $n = 5$ 。ND; 検出せず。

図 2 は、HGF 遺伝子転移ラット中のヒト HGF の mRNA (a ~ d) 及びタンパク質 (e ~ h) の分布を示す写真である。図中の棒のスケールは、a 及び e で 1

00 μ m であり、b～d、g 及び h で 200 μ m である。

図 3 は、元の創傷領域に対する遺伝子転移後の創傷領域の大きさを割合で示す図である。

図 4 は、遺伝子転移後のラットの創傷の端の表皮中での PCNA の発現を示す図 (A) および写真 (B) である。A は遺伝子転移後の表皮中の PCNA 陽性細胞の割合を、B は PCNA の発現を示す写真である。図中 a～c は各々、HGF 遺伝子転移ラットの 3、7 及び 14 日目の写真、d～f はコントロールラットの 3、7 及び 14 日目の写真である。a～f 中の棒のスケールは 200 μ m である。

図 5 は、遺伝子転移後のラットの肉芽組織中での PCNA の発現を検出した結果を示す図 (A) および写真 (B) である。A は遺伝子転移後の肉芽組織中の PCNA 陽性細胞の割合を、B は PCNA の発現を示す。図中 a～c は各々、HGF 遺伝子転移ラットの 3、7 及び 14 日目の写真、d～f は各々コントロールラットの 3、7 及び 14 日目の写真である。a～f 中の棒のスケールは 200 μ m である。

図 6 は、遺伝子転移後のラットの肉芽組織における第 VIII 因子に対する免疫組織化学を用いた微細血管数のカウントの結果を示す図 (A) および写真 (B) である。A は肉芽組織における微細血管数、B は第 VIII 因子についての免疫組織化学の結果を示す。図中 a～c は各々、HGF 遺伝子転移ラットの 3、7 及び 14 日目の写真、d～f は各々コントロールラットの 3、7 及び 14 日目の写真である。a～f 中の棒のスケールは 200 μ m である。

図 7 は、Col α 2 (I) の mRNA についての RT-PCR の結果を示す図である。A は半定量的 RT-PCR 法を用いて選られた Col α 2 (I) の即時増幅プロットであり、B は RT-PCR の閾値サイクルの標準曲線である。

図 8 は、TGF- β 1、Col α 2 (I)、 α -アクチン、デスミン及び Col α 1 (III) の mRNA についての RT-PCR の結果を示す図および写真である。A では PCR 産物の検出を行っており、B は半定量的 RT-PCR の結果である。

図 9 は、遺伝子転移後のラットの創傷中のヒドロキシプロリン濃度を検出した

結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

(1) 創傷組織及び血漿中の HGF タンパク濃度

1. 実験動物 およそ 11 週齢で 310~370 g の重さの 65 匹の雄の Wistar ラットを、2 つの実験のうちの 1 つに割り当て、2 匹ずつ温度管理された、12 時間の明暗サイクルの部屋に収容した。全てのラットに市販の餌及び水道水を任意に与えた。この実験は Care and Use of Laboratory Animals of the National Institute of Health に従って行った。該プロトコルは National Defense Medical College の動物実験の倫理について委員会により承認されたものである。

2. HGF 発現ベクター ヒト HGF cDNA (2.2kb) を pUC-SR α 発現ベクタープラスマドの EcoRI/NotI 部位に挿入した。該プラスミド中、HGF cDNA の転写は SR α プロモーターのコントロールを受ける (Nature 342: 440-443 (1989))。

3. HVJ-リポソーム 子牛胸腺から精製した (HMG)-1 (50 μ l) とプラスミド DNA (200 μ g) を 20°C で、総量 200 μ l となるよう等張液 (137mM NaCl, 5.4mM KC1, 10mM Tris-HCl, pH7.6) で 1 時間混合した後、10mg の乾燥脂質 (ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、コレステロールの 1:4.8:2 の混合物) に添加した。リポソーム-DNA-HMG-1 複合体懸濁液を攪拌し、3 秒間超音波処理し、30 分間振盪しリポソームを形成した。精製センダイウイルス (HVJ) (Z 株) を使用直前、3 分間の UV 照射 (110erg/mm²/秒) により不活化した。リポソーム懸濁液 (0.5ml, 10mg の脂質を含む) と HVJ (30000 血球凝集単位) を総量 3ml の等張液中で混合した。混合後 4°C で 10 分間インキュベートした後、軽く振盪しながら 37°C で 30 分間加温した。遊離の HVJ をショ糖密度遠心分離により除去した。HVJ リポソーム-DNA 複合体を最上層から回収し、すぐに使用した。

4. 創傷組織及び血液試料 41 匹のラットを、創傷の生化学、及び、組織学研究のために 2 つのグループ (HGF 遺伝子転移グループ及びコントロールベクターグループ) に分けた。ペントバルビタールナトリウム (0.5 ml/kg) を腹膜注射してラットを麻酔し、背中の毛を剃り、皮膚を洗浄し、各動物の背中に 14 mm 厚の創傷をつくった。3 日後、同じラット (ペントバルビタール麻酔下) に 100 μ g の HGF cDNA を含む HVJ-リポソーム (500 μ l)、または、コントロールベクターを皮下注射した。27G 針を用いて創傷の端に導入した。注射 3、7 及び 14 日後に麻酔下で動物を断頭し、HGF 測定のため血液試料を採取した。血液試料を EDTA (2 mg/ml) を含む凍結チューブに入れた後、遠心した。直に血漿を凍結し、分析するまで -80°C で貯蔵した。また、解剖時、皮膚を除き、各グループから 5 匹のラットの組織について定量した後二分した。一方を液体窒素中で凍結し、使用するまで -80°C で貯蔵した。

5. ELISA 試験 各グループ毎 5 匹の組織試料を 4 倍量の 0.1% 2M NaCl、0.1% Tween-80、1 mM PMSF 及び 1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl バッファ (pH 7.5) 中、ポリトロン式ホモジエナイザー (24000 rpm; Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) を用いて 1 分間ホモジエナイズした。ホモゲネートを 4°C、15000 \times g で 30 分間遠心し、上清及びペレットを HGF タンパクについての酵素免疫分析 (ELISA) まで -80°C で貯蔵した。ヒト HGF タンパク濃度を抗ヒト-HGF モノクローナル抗体を用いて ELISA で測定し、ラット HGF についても抗ラット-HGF モノクローナル抗体を用いて ELISA で測定した (Institute of Immunology, Tokyo, Japan)。ヒト HGF ELISA 系ではラット HGF ではなくヒト HGF を特異的に検出した。50 μ l ラット血漿中の HGF タンパクの血漿濃度を上述の ELISA を用いて測定した。

6. 結果 創傷組織への HGF 遺伝子転移 3、7 及び 14 日後、HGF 遺伝子転移ラット中のヒト HGF タンパク量は大いに増幅され、コントロールラットでは HGF が全く検出されないことが ELISA により明らかになった (図 1A)。しかしながら、HGF 遺伝子転移ラット由来の血漿試料からはヒト HGF タンパクは検出されなかつ

た。それに対し、HGF 遺伝子転移ラットの創傷組織中のラット HGF 量は、遺伝子転移 3 日後初めて有意に増加した(図 1B、p<0.05)。

(2) 創傷組織中のヒト HGF mRNA 及びタンパク質の発現

(1) に記載の方法と同様の方法により、ラットにおいて創傷を作成し HVJ-リポソームまたはコントロールベクターを投与し、注射 3、7 及び 14 日後に麻酔下で動物を断頭して得た創傷組織を過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド (PLP) 溶液中に固定した。

1. In situハイブリダイゼーション HGF の *in situ* ハイブリダイゼーションのため、脱パラフィン化した 4%パラホルムアルデヒド固定セクションを 0.2N HCl で 20 分間処置した後、2×SSC 中、10 分間 37°Cでインキュベートし、最終的に 5 μg/ml プロテイナーゼ K 中、37°Cで 10 分間インキュベートした。続いて各セクションを 5 分間 4%パラホルムアルデヒド中に固定化し、組織の酸化による非特異的結合を防ぐために 0.25% (容量/容量) 無水酢酸を含む 0.1mol/l トリエタノールアミンバッファー (pH8.0) 中で 10 分間インキュベートした。pUC-SR α 発現ベクタープラスミドの EcoRI 及び NotI 部位中に挿入した完全長ヒト HGF cDNA を、EcoRI を切断する制限酵素で消化し、得られた HGF cDNA (848bp) の断片を pGEM-7zf (+) (Promega, Madison, WI) の EcoRI クローニング部位の間に連結した。アンチセンスプローブ及び対応するセンスプローブを、RNA 標識キット (Boehringer Mannheim, Postfach, Germany) により、各々 SP6 及び T7 ポリメラーゼを用いてジゴキシゲニンで標識した。50% (容量/容量) 脱イオン化ホルムアミド、5×デンハート溶液、5% (重量/容量) 硫酸デキストラン、2×SSC、0.3mg/ml サケ精子 DNA、5mM EDTA 及び 0.01 μg/ml ジゴキシゲニン標識プローブ中、42°Cで一晩ハイブリダイズさせた。55°Cで 20 分間、最終ストリンジエンシーの洗浄を行った後、ハイブリダイゼーションを免疫学的に検出した。

2. 免疫組織化学 脱パラフィン化したセクションに対して直接免疫ペルオキシダーゼ法を適用した。該方法では HGF に対するマウスモノクローナル抗体 (1:2

0, Institute of Immunology, Tokyo, Japan)、及び、ウサギ免疫グロブリンに対する西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体(Chemicon International Inc., 希釈 1:250)を用いた。ヒト HGF に対するマウスモノクローナル抗体によりラット HGF ではなくヒト HGF を特異的に検出した。

3. 結果 HGF 遺伝子転移ラットの創傷組織中、HGF mRNA は遺伝子転移 3 日後の創傷の端の上皮中扁平上皮細胞、血管の内皮細胞及び平滑筋細胞、並びに、肉芽組織中の線維芽細胞で検出された(図 2a, 2b, 2e 及び 2f)。それに対し、全てのコントロールラットでは検出されなかった。同様に、ヒト HGF タンパクが HGF 遺伝子転移ラットの同じ細胞型(上皮中の扁平上皮細胞、血管の内皮細胞及び平滑筋細胞、並びに、肉芽組織中の線維芽細胞)で検出され、コントロールラットではされなかった(図 2c 及び 2g)。その後、遺伝子転移 14 日後(試験最終日)までこの発現は維持された(図 2d 及び 2h)。

(3) 創傷病変サイズ

(1) に記載の方法と同様の方法により、ラットにおいて創傷を作成し HVJ-リポソームまたはコントロールベクターを投与した 20 匹のラットを遺伝子(又はベクター)転移後の創傷範囲の測定に用いた。

1. 創傷範囲の測定 遺伝子転移 0、3、7、10 及び 14 日後にイメージ分析器(TOSPIX-U, AS3260C, 及びイメージ分析パッケージソフトウェア; Toshiba, Tokyo, Japan)を用いて取ったトレーシングで創傷範囲を測定した。創傷範囲は初期範囲(遺伝子転移 0 日後のもの)に対するパーセンテージで表現した。完全な厚さの創傷が完全に上皮で覆われた時点を、完治した日とした。

2. 結果 創傷病変範囲(遺伝子転移 0 日後の元の創傷病変範囲に対するパーセンテージとして表現)は、遺伝子転移 3 日後、HGF 遺伝子転移ラットで有意に減少した(コントロールラットと比べて)(図 3, $p < 0.05$)。しかしながら、HGF 遺伝子転移ラット及びコントロールラットの間で完全に治癒するまでに必要とされる日数に差異はなかった。

(4) 創傷中の細胞増殖及び血管新生

(1) に記載の方法と同様の方法により、ラットにおいて創傷を作成し HVJ-リポソームまたはコントロールベクターを投与し、注射 3、7 及び 14 日後に麻酔下で動物を断頭して得た創傷組織を PLP 中に固定した。

1. 増殖細胞核抗原(PCNA)の測定 細胞増殖の指標として各組織中での PCNA の発現を検出した。脱パラフィン化した上皮、及び、肉芽組織に対して直接免疫ペルオキシダーゼ法を適用した。PCNA に対するマウスモノクローナル抗体 (PC-10, 1:100, Dako Inc., Glostrup, Denmark)、及び、ウサギ免疫グロブリンに対する西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Chemicon International Inc., 希釀 1:250) を用いた。PC-10 に対する免疫組織化学の前に、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中、120°C で 15 分のオートクレーブ前処理を行った。ネガティブコントロールとして、一次抗体とのインキュベーション工程を省いた。PC-10 の分析のため、少なくとも 1000 個の腫瘍細胞での免疫反応に基づいて、免疫反応が陽性であった核の割合を測定した (PCNA 指数)。

2. 血管新生の測定 創傷中の微細血管数を、最も多数の血管を含む領域について光学顕微鏡で評価した。血管数を連続的な 200×の場 (20×対物レンズ及び 10×接眼レンズ; 場当たり 0.0925mm^2) で測定した。また、血管新生は上述の 1. における方法と同様にして、第 VIII 因子に対するポリクローナル抗体 (1:100, Dako Inc., Glostrup, Denmark) を用いて肉芽組織の上皮細胞中の第 VIII 因子を調べることにより測定した。

3. 結果 遺伝子転移 3 及び 7 日後の HGF 遺伝子転移ラット中で創傷の端の上皮、及び、肉芽組織の両方で PCNA 指数はどちらも有意に増加した (コントロールラットと比べて) (図 4 及び 5, $p < 0.05$)。肉芽組織中の微小血管数 (第 VIII 因子の免疫組織化学により検出) は、遺伝子転移 3 日後の HGF 遺伝子転移ラットで有意に増加していた (図 6, $p < 0.05$)。

(5) 創傷中の皮膚成分の発現

(1) に記載の方法と同様の方法により、ラットにおいて創傷を作成し HVJ-リポソームまたはコントロールベクターを投与し、注射 3、7 及び 14 日後に麻酔下で動物を断頭して得た創傷組織から RNA 抽出を行った。

1. 総 RNA 抽出、及び、半定量的 RT-PCR 各グループから 5 匹のラットの皮膚組織中の種々の mRNA の発現を、半定量的 RT-PCR により調べた (Lab. Invest. 79: 679-688 (1999))。皮膚組織中の総 RNA をイソチオシアネート酸グアニジウム-フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿を用いて単離した (Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987))。增幅試薬キット (TaqMan EZRT-PCR キット; Applied Biosystems, Alameda, CA) 及び複数のプライマーを用いて RT-PCR を行った。以下のプライマーを自動 DNA 合成装置で作成した: TGF- β 1, Col α 2 (I), Col α 1 (III), デスミン, α -sm-アクチン及びグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)。用いた全ての PCR プライマー及び TaqMan プローブの配列情報、並びに、温度条件を表 1 に示す (Hepatology 24: 636-642 (1996))。TaqMan プローブの 5' 末端をリポーター色素分子 FAM (6-カルボキシフルオレジン)、及び、3' 末端をクエンチャーカラム TAMRA (6-カルボキシテトラメチルローダミン) で標識した。1 × 反応バッファー、300 μ M dATP、300 μ M dCTP、300 μ M dGTP、600 μ M dUTP、3 mM Mg (OAc)₂、0.1U/ μ l rTth DNA ポリメラーゼ、0.01U/ μ l AmpErase UNG、900 nM プライマー及び 200nM TaqMan プローブの最終濃度を、製造者のプロトコルに従って反応のための原混合物を調製した。RT 反応液を 60°C で 30 分間、続いて AmpErase UNG を不活化するため 95°C で 5 分間インキュベートした。ABI PRISM 7700 Sequence detector (Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。PCR の各サイクルで、rTth DNA ポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により TaqMan プローブを切断し、適当な波長におけるリポーター色素の蛍光を增幅させた。蛍光の増加は、PCR 中のテンプレートの濃度に比例した (図 7A)。閾値蛍光レベルは、テンプレート無しのコントロールで得られた平均値の標準偏差に 6.965 かけた (TaqMan RT-PCR キットのプロトコルに従った)。各 RNA 量毎に 4 個のウェルに

について確立した閾値サイクルを用いて標準曲線を得た(図 7B)。PCR 産物を 3%アガロースゲルでの電気泳動により分離し、エチジウムブロミドで染色した(図 8 A)。

(表 1)

mRNA	センスプライマー (5'-3')	アンチセンスプライマー (5'-3')	TaqMan プローブ (5'-3')	アニーリング 温度 (C)	サイクル	産物の大きさ (bp)
GAPDH	CTTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTCTGGTCATGAG	CCTGGCCAAAGGTCAATCCATGACAACCTT	60	40	238
TGF- β 1	TGAGTGGCTGTCTTTGACGTC	GCAGGTTCTCTGTGGAGCTG	CAGTGGCTAACCAAGGAGACGGAA	64	50	301
Col α 2(I)	GGCTGCTCCAAAAGACAAAT ^G	CCAGAGGTGCAATGTCAAGGA ^A	ATACAAAACGAAATAAGGCCATCTCGCTGC ^C	60	40	97
Col α 1(III)	GTGAAAGAGGATCTGGGGCT ^C	GAGTTCAAGGTGGCAGAAATT ^C	TGCTGCCATTGCTGGAGTTGGA	64	50	302
α -sm- アクチン	CGAT ^C AAACACCGGCATCATCA ^A	GCATAGCCCTCATAGATAGGC ^A	AACTGGGACAGACATGAAAAGATCTGG	60	50	301
デスミン	AGCGCAGAATTGAGTCACTCA ^A	TGTGGTATTCCATCATCTCCT ^A	CTCAGGGACATCCGTGCTCAGTATGAGA	60	50	301

GAPDH, ラットグリセラルデヒドロゲナーゼ, TGF- β 1, ラット形質転換成長因子- β 1; Col α 2(I), ラット α -2型コラーゲン, セグメント2; Col α 1(III), ラットコラーゲンIII型 α -1; デスミン, ラットデスミン, α -sm-アクチン, ラット血管平滑筋 α -アクチン.

2. 結果 半定量的 RT-PCR により、HGF 遺伝子転移ラットの創傷組織中のデ

スミンmRNAの発現は、遺伝子転移3日後コントロールラットと比べて有意に上昇しており、TGF- β 1及びCol α 2(I)mRNAの発現は、遺伝子転移7及び14日後に各々、有意に減少していた(図8B, $p < 0.05$)。

(6) 創傷中のヒドロキシプロリン濃度

(1)に記載の方法と同様の方法により、ラットにおいて創傷を作成しHVJ-リポソームまたはコントロールベクターを投与し、注射3、7及び14日後に麻酔下で動物を断頭して得た創傷組織から組織試料を調製した。

1. ELISA試験 4倍量の0.1%2M NaCl、0.1%Tween-80、1mM PMSF及び1mM EDTAを含む20mM Tris-HC1バッファー(pH7.5)中、ポリトロン式ホモジエナイザー(24000rpm; Kinematica AG, Lucerne, Switzerland)を用いて1分間ホモジエナイズした。ホモゲネートを4°C、15000×gで30分間遠心し、ペレットを6N HCl中に110°Cで16時間加水分解した。ヒドロキシプロリン含量をアミノ酸分析器(モデル835;Hitachi Ltd. Tokyo, Japan)を用いて測定した。

2. 結果 創傷中のヒドロキシプロリン濃度は、遺伝子転移3、7及び14日後のHGF遺伝子転移ラット中、コントロールラットに比べて明らかに低かった(図9, $p < 0.05$)。

上記実施例で得られた結果は各々、平均±平均の標準偏差として表した(SEM)。分散分析(ANOVA)により有意のF値が得られた場合、フィッシャーの保護最小-有意-相違検定(Fisher's protected least-significant-difference test)を適用した。 $p < 0.05$ で有意な相違とした。

産業上の利用の可能性

今回、コントロールラットと比べてHGF遺伝子転移ラットの創傷組織中のヒト及びラットHGFタンパクの量の増加が、ELISA及び免疫組織化学を用いて観察され、同様により早い再上皮化、強力な複数の型の細胞の増殖、及び、強力な血管新生が創傷内で免疫組織化学により観察された。それに対し、創傷治癒の間、創

傷中の TGF- β 1 mRNA 及び Col α 2 (I) mRNA の下向き調節、並びに、ヒドロキシプロリン量の減少を観察した。これらの結果より、皮膚創傷への HGF 遺伝子転移は、創傷治癒工程の一部である再上皮化、及び、血管新生を助ける。また、瘢痕の形成も抑制されるかも知れない。

遺伝子転移 14 日後(試験終了日)、創傷中のヒト HGF 産生が維持されることを確認した。さらに、創傷中のラット HGF 濃度は、遺伝子転移 3 日後、コントロールラットよりも有意に高かった。従って、ヒト HGF 遺伝子はラット HGF の産生の正の調節因子として働くのかも知れない。さらに、この結果は HGF 自身が局所 HGF の産生を自己完結的な陽性フィードバックで調節し、自己分泌-傍分泌方式で調節するという仮説 [Kid. Int. 53: 50-58 (1998); Biochem. Biophys. Res. Commun. 220: 539-545 (1996)] が裏付けられ、HGF 遺伝子を投与することにより、投与を受けた個体における本来の HGF の産生が促進されると考えられる。

本発明により得られた巨視的、及び、組織学的事実は、HGF 遺伝子導入ラットではコントロールラットと比べ、創傷病変範囲のより迅速な減少が見られ、創傷の端の上皮中の基底細胞の超増殖が観察された。そのため、このモデルで HGF mRNA 及びタンパク発現の増加が、創傷内及び創傷を横断しての上皮細胞の分裂、及び、増殖を傍分泌及び/または自己分泌活性により增幅し得ることが示された。本発明では、HGF 遺伝子転移ラットで血管数の増加、及び、肉芽組織中の内皮細胞の PCNA-陽性染色も観察され、HGF が強力な血管新生活性を有することを裏付ける。

本発明では、半定量的 RT-PCR を用いて TGF- β 1 mRNA 発現が HGF 遺伝子転移ラットでは遺伝子転移 7 日後に、コントロールラットと比べて減少していることが観察された。さらに、Col α 2 (I) mRNA 発現は遺伝子転移 14 日後に、ヒドロキシプロリンは遺伝子転移 3、7 及び 14 日後に減少した。この結果、HGF 遺伝子転移ラットでの瘢痕形成が TGF- β 1 合成の下向き調節により抑制されるかもしれないことが示唆された。従って、皮膚への HGF 遺伝子転移は、皮膚纖維症の患者の

処置に有用であるかもしない。

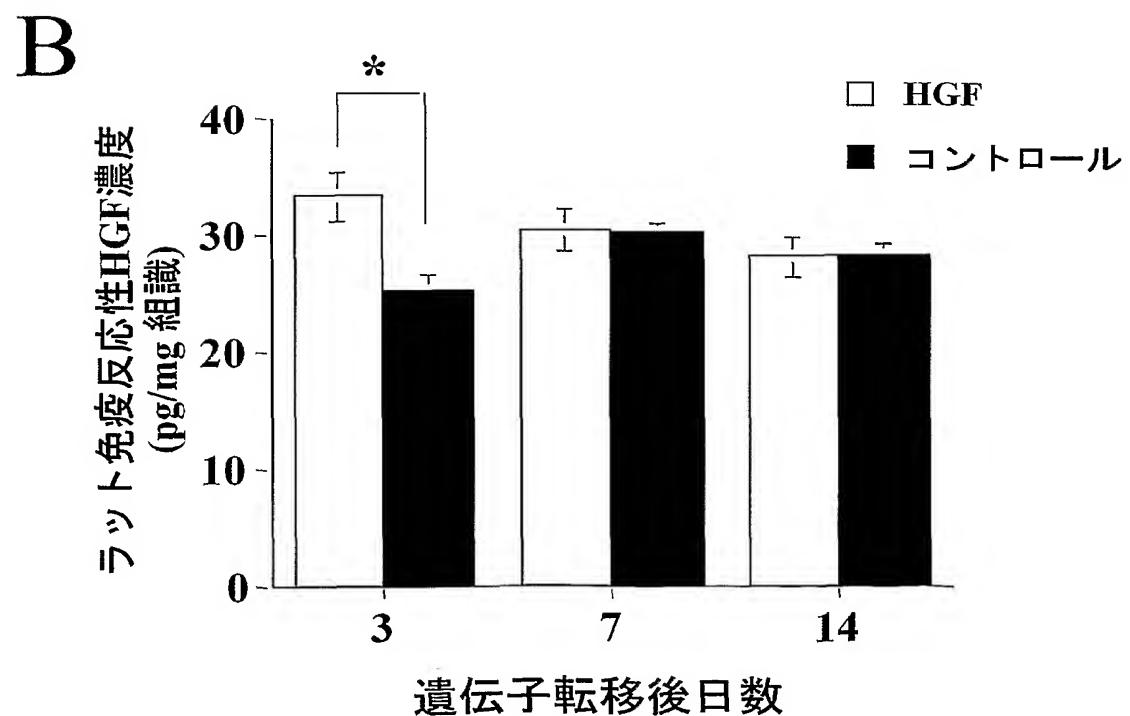
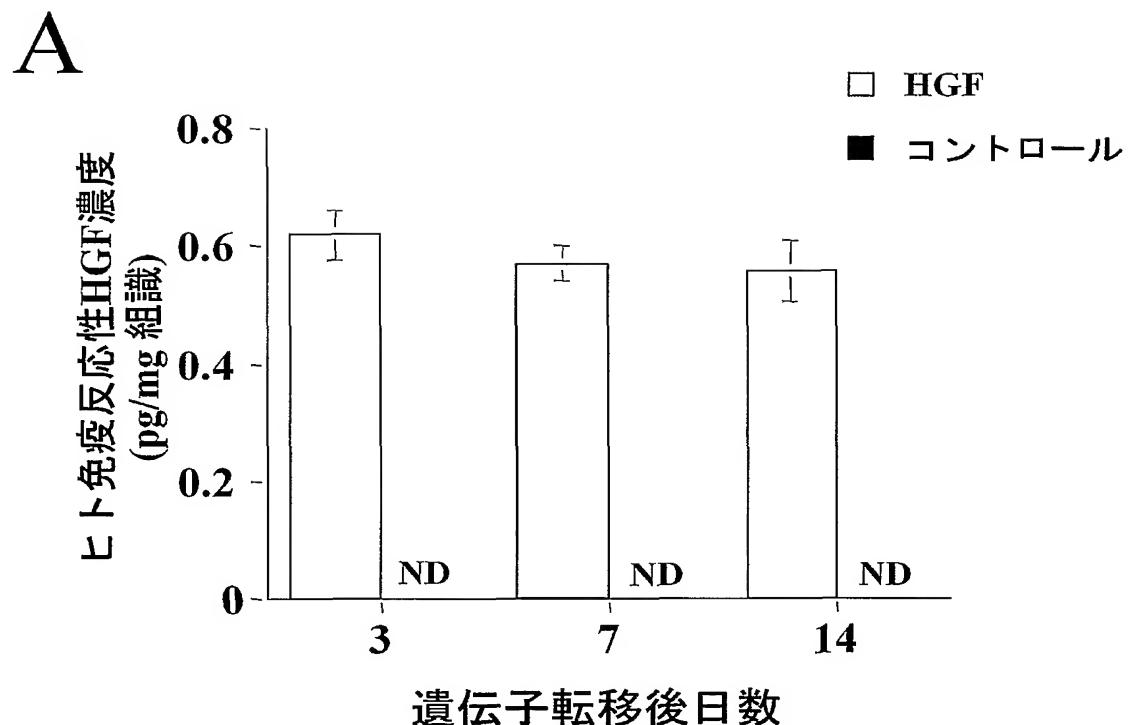
以上の結果により血管新生因子遺伝子転移が創傷治癒の初期段階で有利な効果を有し、血管新生因子が皮膚疾患を調節する役割を果たすかもしだいことが示され、遺伝子転移で誘導した血管新生因子の過剰発現により再上皮化、及び、血管新生の操作は、創傷治癒の分野において新しい治療法の選択を提供する。

請求の範囲

1. 血管新生因子遺伝子を有効成分として含有する皮膚疾患の治療剤又は予防剤。
2. 血管新生因子遺伝子が HGF 遺伝子、VEGF 遺伝子、FGF 遺伝子または HIF 遺伝子である、請求項 1 記載の治療剤又は予防剤。
3. 皮膚疾患が創傷、ハゲ、皮膚潰瘍、褥瘡(床ずれ)、瘢痕(ケロイド)、アトピー性皮膚炎、または、自家移植及び他家移植を含む皮膚移植後の皮膚の損傷である、請求項 1 記載の治療剤又は予防剤。
4. 該治療剤又は予防剤が錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル剤、軟膏、シロップ、スラリー、懸濁物の形態である、請求項 1 又は 2 記載の治療剤又は予防剤。
5. 遺伝子を内包型リポソーム法、静電気型リポソーム法、HVJ-リポソーム法、改良型 HVJ-リポソーム法、ウイルスエンベロープベクター法、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクルガン(遺伝子銃)で担体と共に DNA 分子を細胞に移入する方法、naked-DNA の直接導入法、超音波の照射と共に DNA 分子を細胞に移入する方法、エレクトロポレーション法、または、正電荷ポリマーによる導入法のいずれかにより細胞に移入するための、請求項 1 ～ 3 いずれかに記載の薬剤。
6. 血管新生因子遺伝子を哺乳動物に導入することを含む、皮膚疾患の治療又は予防法。
7. 皮膚疾患の治療剤又は予防剤の製造のための血管新生因子遺伝子の使用。

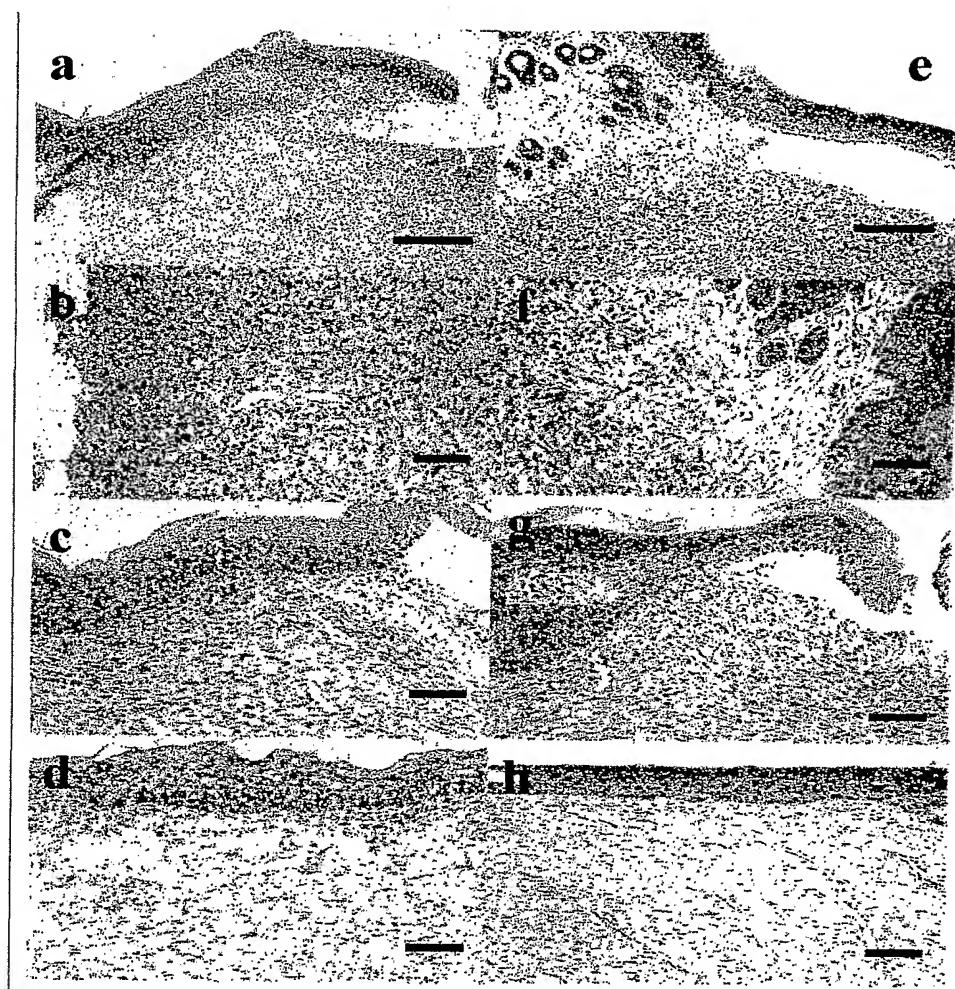
1 / 9

図 1



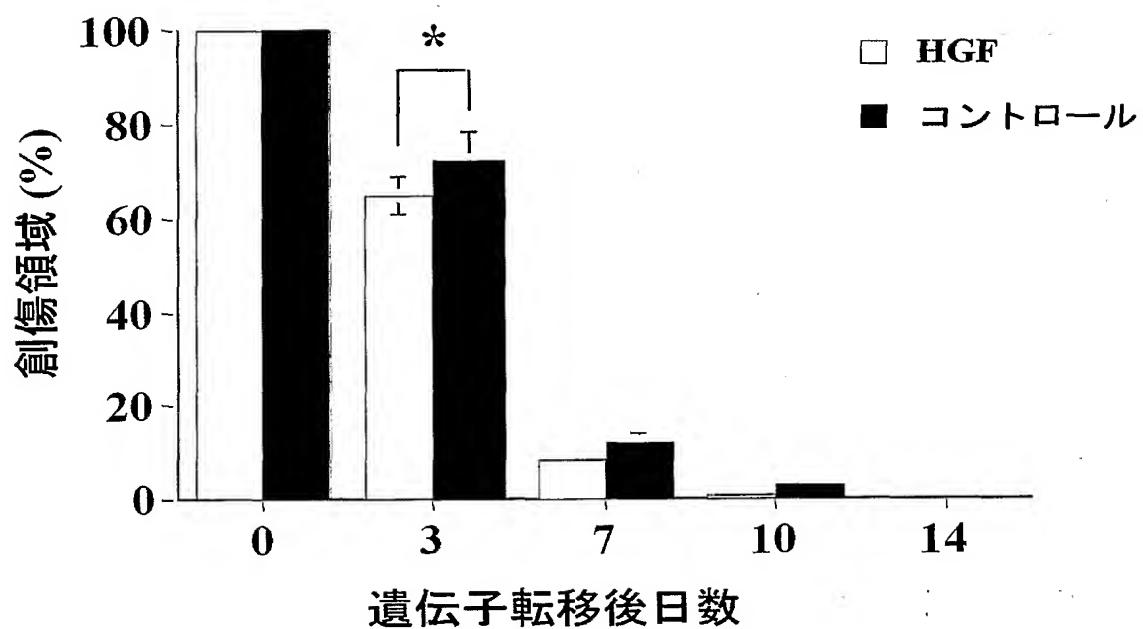
2 / 9

図 2



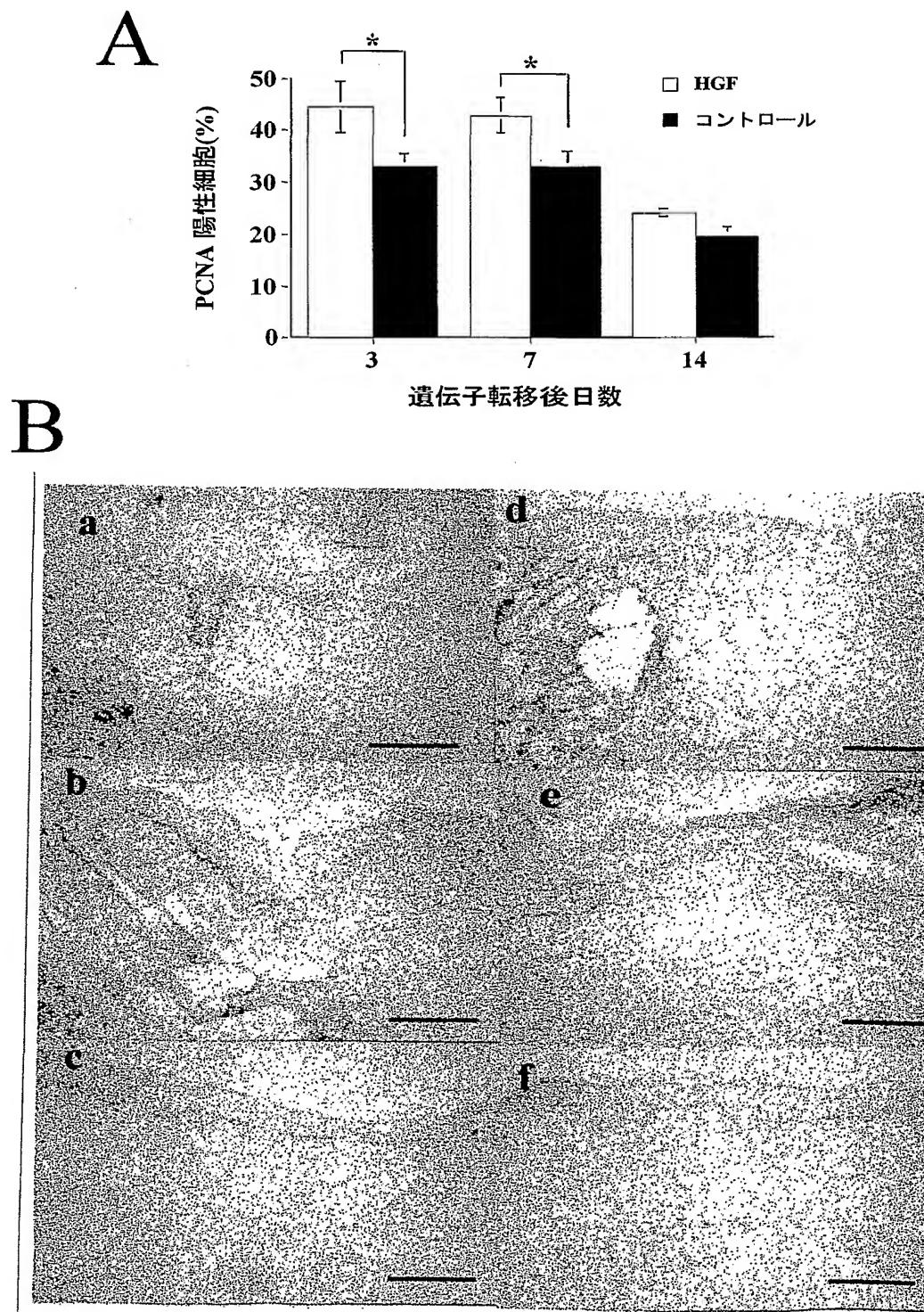
3 / 9

図 3



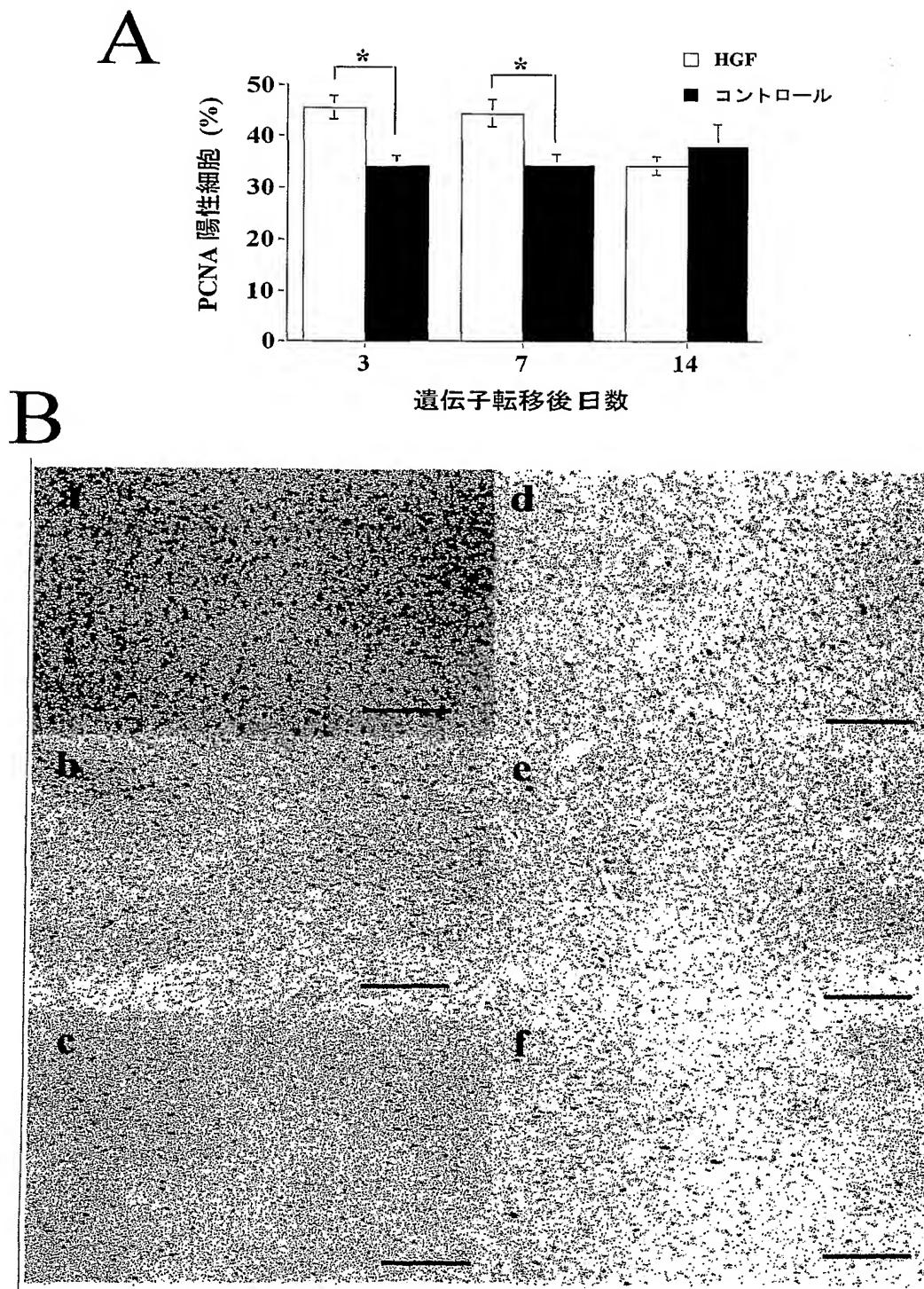
4 / 9

図 4



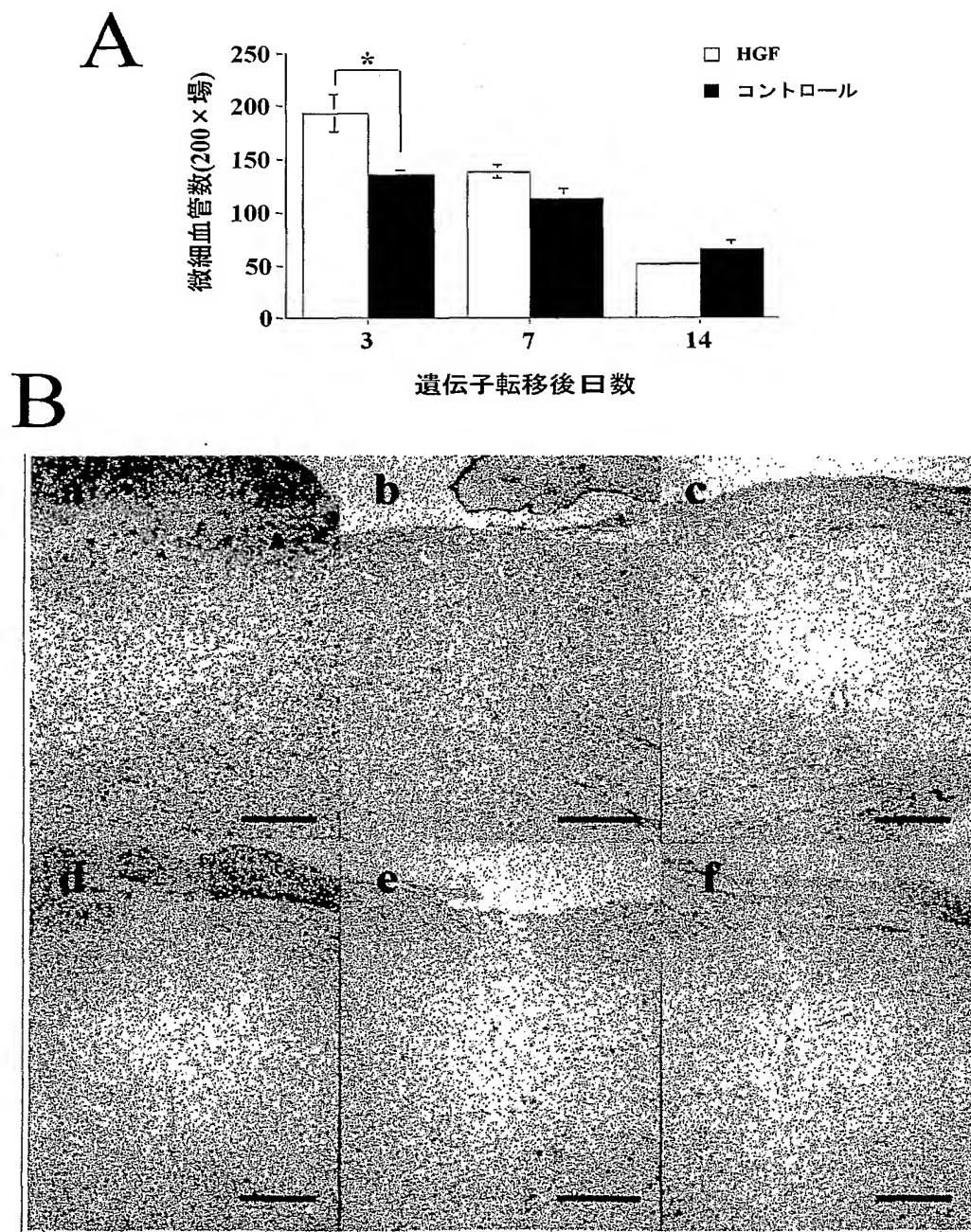
5 / 9

図 5



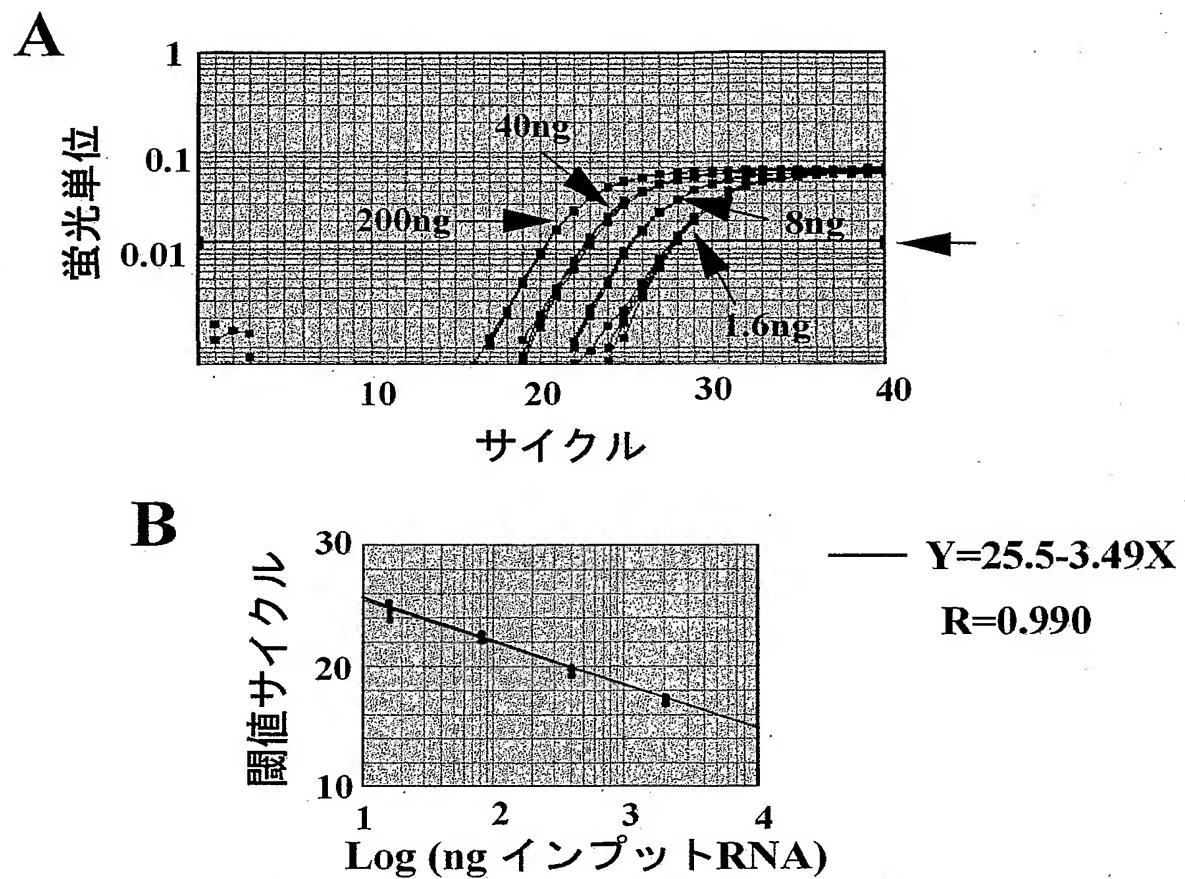
6 / 9

図 6



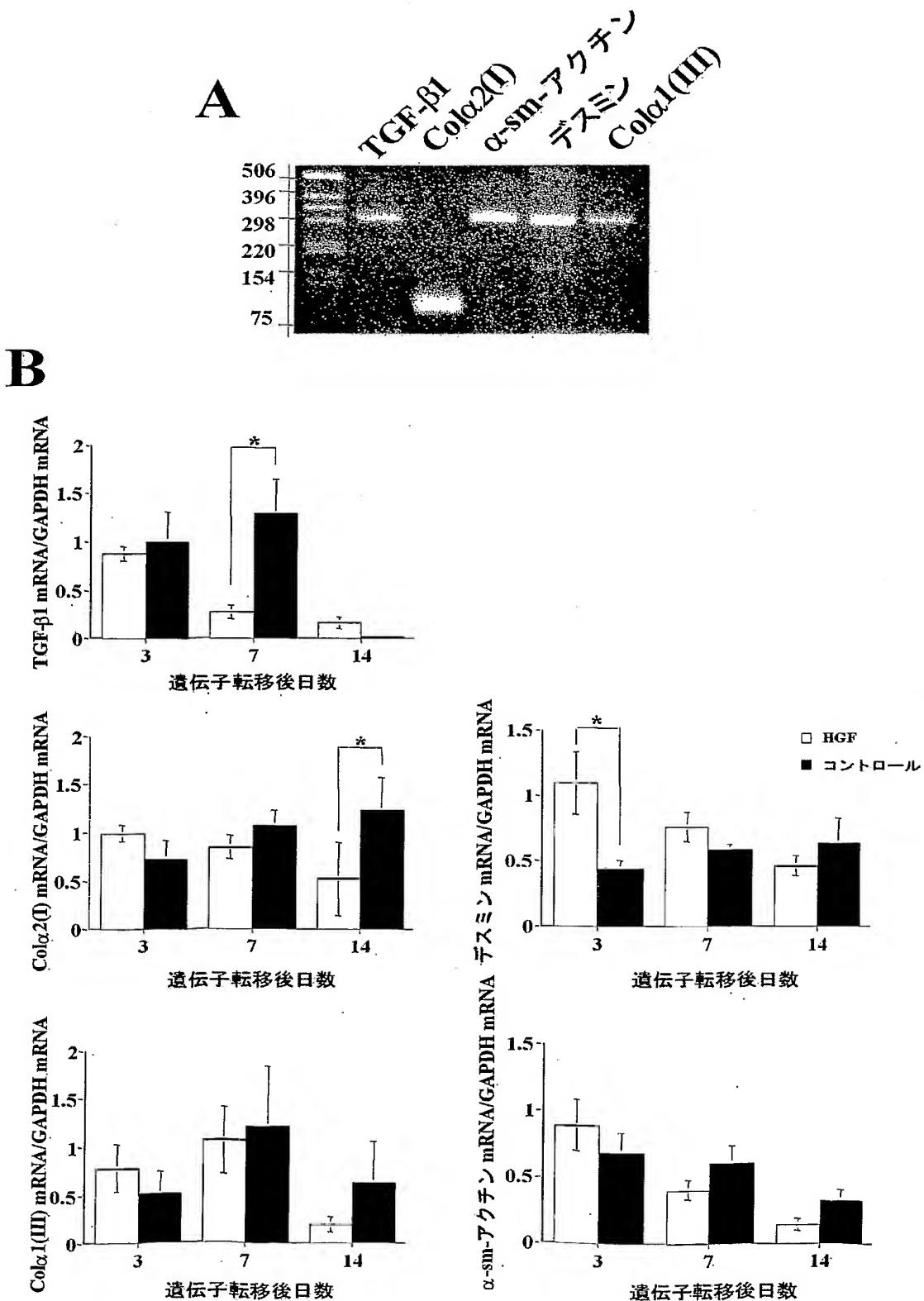
7 / 9

図 7



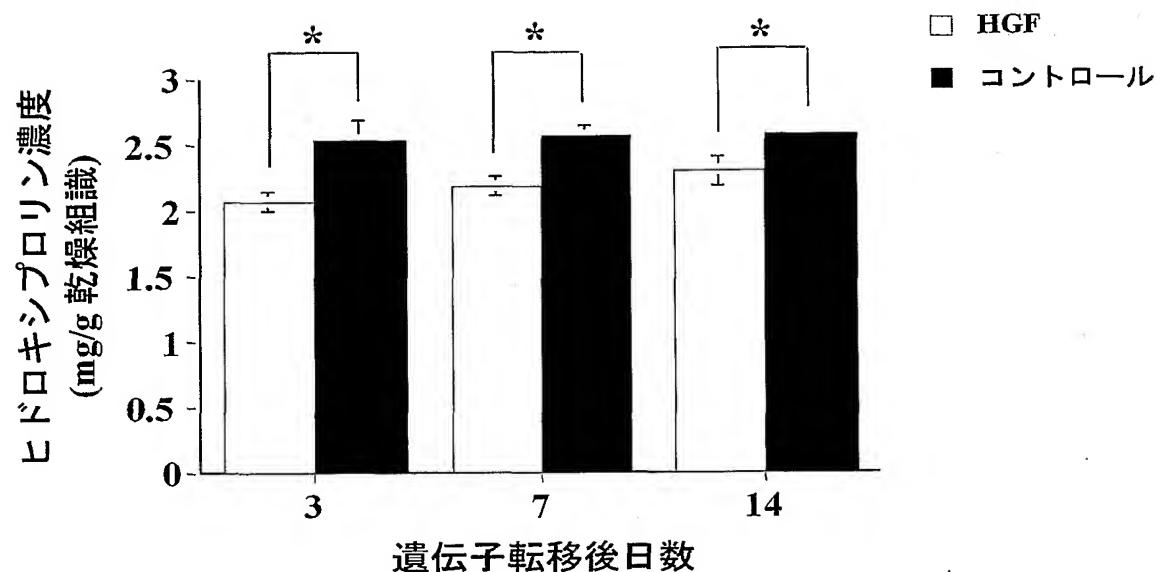
8 / 9

図 8



9 / 9

図 9



1 / 10

SEQUENCE LISTING

<110> ANGES MG, INC.

<120> GENE TRANSFER OF ANGIOGENESIS FACTOR INTO DERMATOSIS

<130> MED-A0103P

<150> JP 2001-139373

<151> 2001-05-09

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 1

cttcaccacc atggagaagg c

2 / 1 0

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 2

ggcatggact gtggcatga g

21

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<400> 3

cctggccaag gtcatccatg acaacttt

28

3 / 1 0

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

tgagtggctg tctttgacg tc

22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

gcagttttc tctgtggagc tg

22

4 / 10

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<400> 6

cagtggctga accaaggaga cggaat

26

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

ggctgctcca aaaagacaaa tg

22

5 / 10

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

ccagagggtgc aatgtcaagg aa

22

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<400> 9

atacaaaacg aataagccat ctcgcctgcc

30

6 / 1 0

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

gtgaaagagg atctgagggc tc

22

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

gagttcaggg tggcagaatt t

21

7 / 1 0

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<400> 12

tgctgccatt gctggagttt ga

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

cgatagaaca cggcatcatc ac

22

8 / 1 0

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

gcatagccct catagatagg ca

22

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<400> 15

aactgggacg acatggaaaa gatctgg

27

9 / 10

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

agcgcagaat tgagtcactc aa

22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

tgtcggtatt ccatcatctc ct

22

1 0 / 1 0

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<400> 18

ctcagggaca tccgtgctca gtatgaga

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, A61P17/02, 17/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, A61P17/02, 17/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	WO 02/044393 A1 (TGT Laboratories, S.A. DE C.V.), 06 June, 2002 (06.06.02), Full text (Family: none)	1-5, 7
X	WO 00/78259 A1 (Research Development Foundation), 28 December, 2000 (28.12.00), Full text & BR 2000012528 A & EP 1210046 A	1-5, 7
A	Karen E. Hamoen et al., Genetically Modified Keratinocytes in a Human Skin Model: Hepatocyte Growth Factor Promotes Wound Healing, Surgical Forum (1999), Vol.50, pages 582 to 584	1-5, 7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 August, 2002 (16.08.02)

Date of mailing of the international search report
03 September, 2002 (03.09.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04529

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gille, Jens et al., Transforming growth factor- α -induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation, The EMBO Journal (1997), Vol.16, No.4, pages 750 to 759	1-5, 7
A	Corral C.J. et al., Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing, Archives of Surgery (1999), Vol.134, No.2, pages 200 to 205	1-5, 7
A	Database MEDLINE on STN, No.2001020109, Scheid A. et al., Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair, Pediatric Surgery International (2000), Vol.16, No.4, pages 232 to 236	1-5, 7
A	US 5827703 A (The Regents of the University of California), 19 May, 1994 (19.05.94), Full text (Family: none)	1-5, 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04529

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C17 A61K 48/00, 38/22, A61P 17/02, 17/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 A61K 48/00, 38/22, A61P 17/02, 17/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EX	WO 02/044393 A1 (TGT LABOEATRIES, S.A. DE C.V.), 2002. 06. 06, 全文(ファミリーなし)	1-5, 7
X	WO 00/78259 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION, 2000. 12. 28, 全文 &BR 2000012528 A &EP 1210046 A	1-5, 7
A	Karen E. Hamoen et al., Genetically Modified Keratinocytes in a Human Skin Model: Hepatocyte Growth Factor Promotes Wound Healing, Surgical Forum (1999) Vol. 50, p. 582-584	1-5, 7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 16. 08. 02	国際調査報告の発送日 03.09.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 八原 由美子 4C 9261 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Gille, Jens et al., Transforming growth factor- α -induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation, The EMBO Journal (1997), Vol. 16, No. 4, p. 750-759	1-5, 7
A	Corral C. J. et al., Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblast growth factor during ischemic wound healing, Archives of Surgery (1999), Vol. 134, No. 2, p. 200-205	1-5, 7
A	Database MEDLINE on STN, No. 2001020109, Scheid A. et al., Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair, Pediatric Surgery International (2000) Vol. 16, No. 4, p. 232-236	1-5, 7
A	U.S. 5 8 2 7 7 0 3 A (The Regents of the University of California) 1994. 05. 19, 全文 (ファミリーなし)	1-5, 7

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲6は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。